

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 55-068293

(43)Date of publication of application : 22.05.1980

(51)Int.Cl.

C12P 1/02
// C12R 1/645

(21)Application number : 53-141720

(71)Applicant : SAKAKIDA MITSU HARU
IKEGAWA TETSUO

(22)Date of filing : 18.11.1978

(72)Inventor : SAKAKIDA MITSU HARU
IKEGAWA TETSUO

(54) PRODUCTION OF CARCINOSTATIC SUBSTANCE

(57)Abstract:

PURPOSE: The mycellia of Matsutake (mushroom) are cultured in a liquid medium and carcinostatic substances, Emitanin-5 are obtained from the mycellia and the filtrate of the culture medium.

CONSTITUTION: The mycellia of Tricholoma matsutake are cultured in a liquid medium and the medium is filtered into the mycellia and the extract is combined with a lower alcohol or acetone, then the precipitate is purified to give Emitanin-5-A. The supernatant is concentrated under reduced pressure and then freeze dried to give Emitanin-5-B. In the meantime, the filtrate of the medium is combined with a lower alcohol or acetone and the precipitate is purified to give Emitanin-5-C. And the supernatant is concentrated under reduced pressure and freeze dried to give Emitanin-5-D. The resulting Emitanin-5-A, B, C, and D are, when necessary, purified by treatment with ion-exchange resin, ultrafiltration, dialysis, chromatography, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—68293

⑪ Int. Cl.³
C 12 P 1/02
// C 12 R 1/645

識別記号

庁内整理番号
6760—4 B

⑬ 公開 昭和55年(1980)5月22日

発明の数 1
審査請求 有

(全 4 頁)

⑭ 制癌物質の製造法

⑮ 特 願 昭53—141720

⑯ 出 願 昭53(1978)11月18日

⑰ 発 明 者 榊田光治

東京都中野区上鷺宮五丁目26番
11号

⑱ 発 明 者 池川哲郎

習志野市袖ヶ浦一丁目12番5号

⑲ 出 願 人 榊田光治

東京都中野区上鷺宮5丁目26番
11号

⑳ 出 願 人 池川哲郎

習志野市袖ヶ浦一丁目12番5号

明 細 書

1. 発明の名称 制癌物質の製造法

2. 特許請求の範囲

マツタケ (*Tricholoma matsutake*) の菌糸体を液体培養し、培養物をろ過後、菌糸体は熱水または希アルカリ溶液で抽出し、抽出液を低級アルコールまたはアセトンで沈澱精製し (エミタニン A)、およびまたはその上澄液は減圧濃縮、凍結乾燥する (エミタニン B)。他方培養母液は低級アルコールまたはアセトンで沈澱精製し (エミタニン C)、およびまたはその上清液は減圧濃縮、凍結乾燥する (エミタニン D)。上記エミタニン A、B、C、D は必要に応じてイオン交換樹脂処理、限外ろ過、透析、クロマトグラフィーにより精製して制癌物質エミタニンを採取することを特徴とする制癌物質エミタニンの製造法

3. 発明の詳細な説明

この発明 (以下本発明という) はマツタケ (*Tricholoma matsutake*) の菌糸体を液体培養し、培養物をろ過後、菌糸体は熱水または希ア

ルカリ溶液で抽出し、抽出液を低級アルコールまたはアセトンで沈澱精製し (エミタニン A)、およびまたはその上澄液は減圧濃縮、凍結乾燥する (エミタニン B)。他方培養母液は低級アルコールまたはアセトンで沈澱精製し (エミタニン C)、およびまたはその上清液は減圧濃縮、凍結乾燥する (エミタニン D)。上記エミタニン A、B、C、D は必要に応じてイオン交換樹脂処理、限外ろ過、透析、クロマトグラフィーにより精製して制癌物質エミタニンを採取することを特徴とする制癌物質エミタニンの製造法に係るものである。

食用キノコの制癌物質に関する研究は、われわれの昭和43年の特許出願 (特許第74450号) の発明に係るものがその最初のものである。

本発明に用いる菌糸体としてはマツタケ (*Tricholoma matsutake*) I F O、6915~6935 で日本微生物株保存機関連盟で保存されているか、または市販の子実体から分離できるものである。子実体からは次のようにして得る。まず新鮮なキノコ子実体を「原色日本菌類図鑑」(保育社発行、

今関六也および本郷次雄著)により同定確認後、表面の汚れを滅菌水で洗い流し、ついで70%酒精綿で表面をぬぐって殺菌し、これを小片にきざむかまたはホモジナイザーで破碎し、寒天培地上に無菌的にのせる。

マツタケの寒天培地としてはグルコース2%、酵母エキス0.2~0.5%、必要に応じ他の添加物(たとえばKH₂PO₄など)を加える。温度22℃~25℃、約3週間で菌糸が発達してくる。

斯くして保存株または子実体より得られた菌糸体を液体培養する。その培養基としては炭素源としてグルコースなどのヘキトース、シュクロースなどの炭水化物が利用し易い。窒素源としては酵母エキス、ペプトン、アミノ酸類またはアンモニウム塩等その他少量の無機、有機の化合物(たとえば第一リン酸カリ、硫酸マグネシウム、クエン酸鉄、ニコチン酸、葉酸等)の添加も有効である。培養基のpHは4.0~7.5の範囲、温度は20℃~27℃が好ましく、静置または緩徐に振盪しながら培養する。培養期間は約5週間を要する。

-3-

ン硫酸反応、過沃素ベンチジン反応、ナフトレゾルシン反応等が陽性で、過クロル鉄反応、マグネシウム酢酸反応は陰性である。赤外部吸収スペクトルの吸収特性も確認した。この物質は水に溶解し、ベンゼン、ヘキサン、アセトン等の有機溶媒には難溶であるが、熱メタノール、熱エタノール等に対してはわずかに溶解する。なおその理化学的性質についてはこの明細書の末尾に第1表として示した。

本発明に係る物質について制癌試験を行つた。肉腫180をIORマウスの皮下に移植したのち24時間後から試料10mg/kg/dayで10日間腹腔に投与すると固型癌の増殖は、無処理のマウス群と較べてエミタニンAで78%、同Bで69%、同Cで80%、同Dで70%阻止された。毒性はみられなかつた。

実施例

マツタケ(*Tricholoma matsutake*) I F O 6915~6935の保存株をグルコース2%、酵母エキス0.5%、pH4.5の寒天培地に移植し

-5-

本発明により得られる有効成分は菌糸体の成分としてもまた培養液中にも生産され、菌糸体成分からは熱水抽出により抽出(希アルカリ水溶液で抽出する場合は、これを酢酸で中和させる)したのち2~5倍量のアルコールまたはアセトンなどの水と任意に混合する有機溶媒を加えて沈澱精製し(エミタニンA)、その上澄液からはこれを減圧濃縮、凍結乾燥する(エミタニンB)。一方培養液は同様のアルコールまたはアセトンで沈澱精製し(エミタニンC)、その上澄液は減圧濃縮、凍結乾燥させる(エミタニンD)。

上記エミタニンA、B、C、Dは必要に応じ、これを精製することができる。エミタニンAおよびCの精製はイオン交換樹脂処理、ついでラボモジュールまたはダイアフロー膜を用いる限外濾過、透析、クロマトグラフィーにより、エミタニンBおよびDはイオン交換樹脂処理、限外濾過、クロマトグラフィーにより精製する。

本発明により得られる制癌物質エミタニンは、フェノール硫酸反応、モーリッシュ反応、アンスロ

-4-

で22℃で3週間培養する。増殖した菌糸体をかきとり、これをホモジナイジしてグルコース2%、乾燥酵母0.5%、pH4.5の液体培地3%に移植し、24℃、5週間緩く振盪しながら培養する。培養終了後これを遠心分離して菌糸体と培養液に分離する。菌糸体(310g)は1Lの熱水により約5時間、2回にわたり抽出し、これを減圧濃縮して1Lとし、冷却後3倍量のエタノールを加え、生ずる沈澱を遠心分離する。これを100mLの水に溶かし0.5NのNH₄OH30mLを加え、生ずる沈澱を遠心分離する。これを透析後、凍結乾燥すると約125mgの灰白色のエミタニンAが得られる。エタノールを加え生ずる沈澱を遠心分離したその上澄液は減圧濃縮、凍結乾燥して灰黄色のエミタニンB約400mgが得られる。一方培養液の方は3倍量のエタノールを加えて生ずる沈澱をエミタニンA同様に処理して得られる灰白色の物質をさらにセフアデックス0-200のカラムクロマトグラフィーにかけて水で溶出すると白黄色のエミタニンC約60mgが得られる。

-6-

第 1 表

| 別名 | 区 分 | 分子 量 | 分子 式 | 融 点 | 元素分析値(%) |
|------------------|------------|----------------------|--|--------------|---------------------------------|
| マ ツ タ ケ | エミタニン A | 10 ⁴ 以上 | (C ₁₀ H ₁₀ O) _n | 150°~260°で分解 | C: 32.03 H: 7.51 O: 58.91 |
| | エミタニン B | 10 ⁶ 以下 | C ₁₀ H ₁₀ Nを含む | 150°~260°で分解 | C: 34.99 H: 5.71 N: 3.43 |
| | エミタニン C | 10 ⁴ 以上 | C ₁₀ H ₁₀ Nを含む | 150°~260°で分解 | C: 30.12 H: 5.47 N: 5.51 |
| | エミタニン D | 5×10 ⁴ 以下 | C ₁₀ H ₁₀ Nを含む | 150°~260°で分解 | C: 35.61 H: 6.13 N: 6.89 |

| 呈 色 反 応 | 比 較 光 度 | 赤 外 吸 収 ス ペ ク ト ル |
|--------------------------------------|---------|--|
| フェノール硫酸反応+ モリッシュ反応+ アンスロン硫酸反応+ | +20° | 3,300cm ⁻¹ 付近にO-Hの伸縮振動 2,900cm ⁻¹ 付近にC-Hの伸縮振動 1,000~1,100cm ⁻¹ 付近にC-H, C-Oの変角振動を有する。 |
| フェノール硫酸反応+ モリッシュ反応+ アンスロン硫酸反応+ | +12° | 3,300cm ⁻¹ 付近にO-Hの伸縮振動 2,900cm ⁻¹ 付近にC-Hの伸縮振動 1,000~1,100cm ⁻¹ 付近にC-H, C-Oの変角振動を有する。 |
| フェノール硫酸反応+ モリッシュ反応+ アンスロン硫酸反応+ | +5° | 3,300cm ⁻¹ 付近にO-Hの伸縮振動 2,900cm ⁻¹ 付近にC-Hの伸縮振動 1,000~1,100cm ⁻¹ 付近にC-H, C-Oの変角振動を有する。 |
| フェノール硫酸反応+ モリッシュ反応+ アンスロン硫酸反応+ | +7° | 3,300cm ⁻¹ 付近にO-Hの伸縮振動 2,900cm ⁻¹ 付近にC-Hの伸縮振動 1,000~1,100cm ⁻¹ 付近にC-H, C-Oの変角振動を有する。 |

-7-

手 続 補 正 書 (自発)

昭和54年11月27日

特許庁長官 川 原 能 雄 殿

1. 事件の表示 特願昭53-141720号

2. 発明の名称 制癌物質の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都中野区上鷺宮五丁目26番11号

郵便番号 165 電話東京(03)999-2122

氏名

補 田 光 治

4. 補正の対象 「明細書の特許請求の範囲の欄」

「明細書の発明の詳細な説明の欄」

5. 補正の内容 別紙のとおり

補 正

1. 特許請求の範囲の欄

(1) 明細書第1頁第7~8行「(エミタニンA)」を「(エミタニン-5-A)」に訂正する。以下同第9行「(エミタニンB)」を「(エミタニン-5-B)」に、同第10~11行「(エミタニンC)」を「(エミタニン-5-C)」に、同第12行「(エミタニンD)」を「(エミタニン-5-D)」に、同第12~13行「エミタニンA, B, C, D」を「エミタニン-5-A, B, C, D」に、同第15行「エミタニン」を「エミタニン-5」に、同第16行「エミタニン」を「エミタニン-5」にそれぞれ訂正する。

(2) 補正後の特許請求の範囲

マツタケ (*Tricholoma matsutake*) の菌糸体を液体培養し、培養物を濾過後、菌糸体は熱水または希アルカリ溶液で抽出し、抽出液を低級アルコールまたはアセトンで沈澱精製し(エミタニン-5-A)、およびまたはその上澄液は減圧濃縮、凍結乾燥する(エミタニン-5-B)。他方培養



母液は低級アルコールまたはアセトンで沈澱精製し(エミタニン-5-0)、およびまたはその上清液は波田濃縮、凍結乾燥する(エミタニン-5-D)。上記エミタニン-5-A、B、C、Dは必要に応じてイオン交換樹脂処理、限外濾過、透析クロマトグラフィーにより精製して制癌物質エミタニン-5を採取することを特徴とする制癌物質エミタニン-5の製造法。

2. 発明の詳細な説明の欄

(1) 明細書第5頁第7行「溶解する。」の次に「エミタニン-5の水溶液のpHをはかると、6～8を示す。」の23字を加入する。

(2) 明細書末尾の第1表下段右端に、^{1/2}の表示を加入する。

| 水溶液のpH値 |
|---------|
| 6～8(中性) |
| 6～8(中性) |
| 6～8(中性) |
| 6～8(中性) |

(3) この欄に記載した次の「エミタニン」は「エミタニン-5」に訂正し、「エミタニンA(またはB、C、D)」は「エミタニン-5-A(または

B、C、D)に訂正する。明細書第2頁第2行(エミタニンA)、同第4行(エミタニンB)、同第5行(エミタニンC)、同第7行(エミタニンD)、同第7～8行エミタニンA、B、C、D同第10行エミタニン、同第11行エミタニン、同第4頁第7行(エミタニンA)、同第8行(エミタニンB)、同第10行(エミタニンC)、同第11行(エミタニンD)、同第12行エミタニンA、B、C、D、同第13行エミタニンA、同第16行エミタニンB、同第19行エミタニン、同第5頁第14行エミタニンA、同第6頁第15行エミタニンB、同第17行エミタニンA、同第20行エミタニンC、同第7頁第3行エミタニン。末尾第1表区分欄上からエミタニンA、エミタニンB、エミタニンC、エミタニンD。

以上